

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-036400

(43)Date of publication of application : 10.02.1998

(51)Int.Cl.

C07K 16/12
A61K 7/16
A61K 39/395
C12N 5/10
C12N 15/02
C12P 21/08
G01N 33/569
G01N 33/577
//(C12P 21/08
C12R 1:91)

(21)Application number : 08-207870

(71)Applicant : LION CORP

(22)Date of filing : 18.07.1996

(72)Inventor : OISHI HIDEYUKI

(54) MONOCLONAL ANTIBODY, COMPOSITION FOR ORAL CAVITY APPLICATION AND BASIS FOR DIAGNOSIS AND RESEARCH**(57)Abstract:**

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new monoclonal antibody specifically reacting with *Streptococcus mutans* in an antibody-excess region to form a plateau on a volume-action curve of an antigen-antibody reaction and useful for the prevention, treatment, diagnosis, research, etc., of the cariogenesis in the oral cavity.

SOLUTION: This new monoclonal antibody is specifically reactive with *Streptococcus mutans* (serum type: c/e/f) in an antibody excess region to form a plateau on a volume-action curve of an antigen-antibody reaction and non-reactive with *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus sanguis*. It is effective for the prevention and treatment of cariogenesis in the oral cavity and useful also as a basis for the diagnosis and research of the caries in the oral cavity. The monoclonal antibody can be produced by immunizing a BALB/c mouse with a protein antigen separated from *Streptococcus mutans*, collecting the spleen cells from the mouse, fusing with a myeloma cell, monoclonizing by clone selection and culturing the obtained hybridoma.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-36400

(43) 公開日 平成10年(1998) 2月10日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 16/12			C 0 7 K 16/12	
A 6 1 K 7/16			A 6 1 K 7/16	
39/395	A D Z		39/395	A D Z R
C 1 2 N 5/10			C 1 2 P 21/08	
15/02			G 0 1 N 33/569	F
審査請求 未請求 請求項の数 4 F D (全 11 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平8-207870

(22) 出願日 平成 8 年(1996) 7 月18日

(71) 出願人 000006769

ライオン株式会社

東京都墨田区本所 1 丁目 3 番 7 号

(72) 発明者 大石 秀之

東京都墨田区本所 1 丁目 3 番 7 号 ライオン株式会社内

(74) 代理人 弁理士 小島 隆司

(54) 【発明の名称】 モノクローン抗体、並びに口腔用組成物及び診断・研究用基剤

(57) 【要約】

【課題】 口腔内のう蝕原性細菌であるストレプトコッカス・ミュータンスと特異的に反応するモノクロナール抗体を得る。

【解決手段】 抗原抗体反応の容量-作用曲線がブラットとなるような抗体過剰域でストレプトコッカス・ミュータンス(血清型 c/e/f)と特異的に反応して、他のストレプトコッカス属菌であるストレプトコッカス・ミティス、ストレプトコッカス・サリバリウス、及びストレプトコッカス・サンギスと反応しないことを特徴とするモノクローン抗体。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 抗原抗体反応の容量-作用曲線がブラト一となるような抗体過剰域でストレプトコッカス・ミュータンス（血清型c/e/f）と特異的に反応して、他のストレプトコッカス属菌であるストレプトコッカス・ミティス、ストレプトコッカス・サリバリウス、及びストレプトコッカス・サンギスと反応しないことを特徴とするモノクローン抗体。

【請求項2】 請求項1記載のモノクローン抗体を産生する細胞。

【請求項3】 請求項1記載のモノクローン抗体を含有してなる口腔用組成物。

【請求項4】 請求項1記載のモノクローン抗体を含有してなる診断・研究用基剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ストレプトコッカス・ミュータンス（Streptococcus mutans、血清型c/e/f）と特異的に反応するモノクローン抗体、並びに口腔用組成物及び診断・研究用基剤に関し、更に詳述すると、反応特異性が極めて高く、口腔内のストレプトコッカス・ミュータンスの存否、多寡を正確に検出することができる上に、う蝕原性細菌であるストレプトコッカス・ミュータンスを口腔内から特異的に排除でき、う蝕の効果的な予防が可能となるモノクローン抗体、並びに該モノクローン抗体を配合した口腔用組成物及び診断・研究用基剤に関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】従来より、ストレプトコッカス・ミュータンスはう蝕原性細菌として口腔衛生の分野で注目されており、口腔内のストレプトコッカス・ミュータンスの存在とう蝕の発生の間には密接な関係があることが広く知られている。

【0003】この場合、ストレプトコッカス・ミュータンスはう蝕の有力な原因菌であるミュータンスレンサ球菌群（mutans streptococci）の菌として分類されている。現在、同群にはストレプトコッカス・ミュータンス（Streptococcus mutans、血清型c/e/f）の他に、ストレプトコッカス・クリセタス（S. cricetus、血清型a）、ストレプトコッカス・ラッタス（S. rattus、血清型b）、ストレプトコッカス・ソブリヌス（S. sobrinus、血清型d/g）、ストレプトコッカス・ドウェイ（S. downei、血清型h）、ストレプトコッカス・フェルス（S. ferus、血清型c）の各菌が含まれている。これらの中で、ヒト口腔内から高頻度で分離される菌としてはストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスがあり、中でもストレプトコッカス・ミュータンスはう蝕の発生に深く関連することが知られている。

【0004】このため、う蝕の発生と密接に関連するストレプトコッカス・ミュータンスの存否、多寡を測定することによりう蝕罹患の危険性（カリエス・リスク）を予測する提案がなされている（特開平1-250067号公報）。この提案は、ストレプトコッカス・ミュータンスの存否、多寡をストレプトコッカス・ミュータンスに対するモノクローン抗体又はポリクローン抗体を用いて検出するものであり、免疫学的測定法であるため、ストレプトコッカス・ミュータンスの検出に要する時間が大幅に短縮でき、結果が判明するまでに1日以上を要する細菌学的培養法に比べ、迅速性に優れ、細菌学に関する専門的な知識や技術、特殊な設備を必要としないものである。

【0005】一方、ストレプトコッカス・ミュータンスと同じストレプトコッカス属に分類される菌が多数常在菌として口腔内に存在していることが知られており、特にストレプトコッカス・ミティス（S. mitis）、ストレプトコッカス・サリバリウス（S. salivarius）、ストレプトコッカス・サンギス（S. sanguis）の3菌種は、口腔内細菌叢中の主要細菌である。この場合、口腔内の部位により細菌の存在の相対比率は異なるが、カリエス・リスク診断時の検体として繁用される唾液については、上記3菌種で口腔内細菌叢の50%近くを占めている。

【0006】また一般に、唾液1ml中の総菌数は 10^8 個以上といわれており、上記3菌種とも唾液1ml中に、各々 10^6 個程度のオーダーで存在するものと考えられる（G. Niki foruk著、榊 鉄也監訳、「齲蝕1-病因論とメカニズム」、104～136頁（1987）、学建書院）。

【0007】なお、ストレプトコッカス・ミュータンスの総菌数は個人差が大きいため一概には言えないが、いわゆる「う蝕ハイリスク」といわれる場合で唾液1ml中に 10^6 個レベル、「ストレプトコッカス・ミュータンスの定着に必要」といわれているレベルで同じく $10^4 \sim 10^5$ 個程度であると報告されている。

【0008】この点について、武井の報告によると、ヒトの唾液1ml中のストレプトコッカス・ミュータンス（この場合、正確にはミュータンスレンサ球菌群）のレベルは 10^5 個のレベル以下であり、ストレプトコッカス・ミュータンスの血清型分布はc型が最も多く、次いでe型が多く、f型は少なかった。また、ストレプトコッカス・ソブリヌスはd/g型ともに低い検出率であった（武井 勉、大阪大学歯学雑誌、35：93（1990））。

【0009】従って、カリエス・リスクを正確に診断するためには、 $10^2 \sim 10^4$ 倍以上の比率で存在する上記ストレプトコッカス属の3種の菌の中からストレプトコッカス・ミュータンスのみを正確に検出することが必要となり、ストレプトコッカス・ミュータンスに対する極

めて高い反応特異性が検出に用いる抗体に要求される。即ち、口腔内での存在比率が高く、測定妨害となるストレプトコッカス・ミティス、ストレプトコッカス・サリバリウス、ストレプトコッカス・サンギスの3菌種に対しては全く反応しない(測定のバックグラウンド以下)という極めて高い反応特異性が要求される。

【0010】この点に関して、上記特開平1-250067号公報に開示されている技術は、種特異性の高い血清型多糖抗原に対する抗体を使用することにより上記課題を解決している。しかしながら、血清型多糖抗原はストレプトコッカス・ミュータンスでは上述した通り、c/e/fの3種類が存在するため、少なくとも3種類の抗体を使用しなければストレプトコッカス・ミュータンスを正確に検出することができず、操作性、迅速性に劣るという問題点があった。

【0011】上記問題点を解決するために、c/e/f各血清型に共通するエпитープに対するモノクローン抗体を利用する試みが検討されている。例えば、ストレプトコッカス・ミュータンスのみに反応するモノクローン抗体に関する技術についてはロバート・スミス等(R. O. BERTA SMITH, et al., Infect. Immun., 46:168 (1984))が報告しているが、この提案では他のストレプトコッカス属菌に対する反応特異性の検討が不十分かつ不明であり、抗原抗体反応の容量-作用曲線に関する記述もなされていない。

【0012】また、ファビエンヌ・アッカーマンス等の報告(FABIENNE ACKERMANS, et al., Infect. Immun., 49:344 (1985))に記載されている抗原抗体反応の容量-作用曲線のプロファイルに見られるとおり、一般に抗体の量が増加すると、本来反応性が弱い菌体でも反応応答が出現し、検出を妨害し反応特異性に問題が生じることが知られている。

【0013】従って、口腔内のストレプトコッカス・ミュータンスのみを、 $10^2 \sim 10^4$ 倍以上の比率で他のストレプトコッカス属の菌(特に、ストレプトコッカス・ミティス、ストレプトコッカス・サリバリウス、ストレプトコッカス・サンギス)が共存する試料の中から正確に検出するためには、これら検出の妨害となりうる菌に対しては、「どのような条件下でもバックグラウンド以下の反応性しか示さない」という極めて高い反応特異性が保証できるような抗体を使用しない限りストレプトコッカス・ミュータンスの正確な検出は困難である。

【0014】この点について公知文献を精査してみると、特開平2-177898号公報に開示されているモノクローン抗体については、ストレプトコッカス・サリバリウスについてバックグラウンドをやや上回る程度の弱い交差性が認められており、この微弱な応答がストレプトコッカス・ミュータンス検出の妨害となりうること

を特開平5-5744号公報に開示されたデータが示している。即ち、 10^7 個レベルのストレプトコッカス・サリバリウスと 10^5 個レベルのストレプトコッカス・ミュータンスの応答性は同程度となり、実際の口腔内での両者の存在比はこれよりも大きい場合があり、この場合より大きな妨害となり、誤った診断結果を下す危険性が憂慮されている。

【0015】従って、未だ十分な反応特異性を有し、ストレプトコッカス・ミュータンスと特異的に反応し、他のストレプトコッカス属菌と反応しないモノクローン抗体は得られておらず、その開発が望まれていた。

【0016】本発明は、上記事情を鑑みなされたもので、ストレプトコッカス・ミュータンスと特異的に反応し、他のストレプトコッカス属菌と反応しないために、ストレプトコッカス・ミュータンスの存否、多寡の検出、及び排除に有効なストレプトコッカス・ミュータンスと特異的に反応するモノクローン抗体、並びに該モノクローン抗体を配合した口腔用組成物及び診断・研究用基剤を提供することを目的とする。

【0017】

【課題を解決するための手段及び発明の実施の形態】本発明者らは、上記目的を達成するために、ストレプトコッカス・ミュータンスに対する極めて高い反応特異性を有するモノクローン抗体を開発すべく、鋭意検討を重ねた結果、ストレプトコッカス・ミュータンスに対するモノクローン抗体を産生可能な細胞を樹立し、この細胞から得られたモノクローン抗体を、モノクローン抗体過剰域でストレプトコッカス属の菌に対する反応特異性を厳しく解析した結果、樹立したクローン数としては少数ではあるが、う蝕の原因菌であるストレプトコッカス・ミュータンス(血清型c/e/f)とのみ反応し、他のストレプトコッカス属菌と反応しないモノクローン抗体を見出した。

【0018】即ち、ストレプトコッカス・ミュータンスのc/e/f各血清型に共通するエпитープに対するモノクローン抗体を産生可能な細胞を樹立し、この細胞から得られたモノクローン抗体を、ストレプトコッカス・ミュータンス菌体上の反応可能な全エпитープに抗体が結合し、抗原抗体反応の容量-作用曲線がプラトーとなるような高濃度に抗体が添加された過酷な条件、即ち、本来反応性が弱い菌体でも反応応答が出現し、反応特異性に問題が生じるようなモノクローン抗体過剰域において反応特異性を解析したところ、ストレプトコッカス・ミュータンス(血清型c/e/f)と高い反応性を示し、他のストレプトコッカス属の菌、特に口腔中の存在比率が高く測定妨害となるストレプトコッカス・ミティス、ストレプトコッカス・サリバリウス、ストレプトコッカス・サンギスとは、どのような条件下でもバックグラウンド以下の反応性しか示さないという極めて高い反応特異性を有するモノクローン抗体が得られ、カリエ

ス・リスクの正確な診断、及び腐蝕性菌の特異的排除が可能となり、口腔衛生分野での大きな期待に応えることができることを見出し、本発明をなすに至ったものである。

【0019】従って、本発明は、(1) 抗原抗体反応の容量-作用曲線がプラトーとなるような抗体過剰域でストレプトコッカス・ミュータンス(血清型c/e/f)と特異的に反応して、他のストレプトコッカス属菌であるストレプトコッカス・ミティス、ストレプトコッカス・サリバリウス、及びストレプトコッカス・サンギスと反応しないことを特徴とするモノクローン抗体、(2) (1) 記載のモノクローン抗体を産生する細胞(3) (1) 記載のモノクローン抗体を含有してなる組成物、及び、(4) (1) 記載のモノクローン抗体を含有してなる診断・研究用基剤を提供する。

【0020】以下、本発明につき更に詳しく説明すると、本発明のモノクローン抗体は、抗原抗体反応の容量-作用曲線がプラトーとなるような抗体過剰域でストレプトコッカス・ミュータンス(血清型c/e/f)と特異的に反応して、他のストレプトコッカス属菌である

ストレプトコッカス・ミティス、ストレプトコッカス・サリバリウス、及びストレプトコッカス・サンギスと反応しない」とは、①ストレプトコッカス・ミュータンス菌体上の反応可能な全エピトープに抗体が結合した状態、即ち抗原抗体反応の容量-作用曲線がプラトーとなるような高濃度の抗体が添加される反応系で、②他のストレプトコッカス属菌、特にストレプトコッカス・ミティス、ストレプトコッカス・サリバリウス、ストレプトコッカス・サンギスの3種類に対する反応性がバックグラウンド以下である、という二つ条件を同時に満たすことをいう。

【0022】また、①の抗原抗体反応の容量-作用曲線がプラトーとなるような高濃度の抗体とは、抗体が抗原の反応すべき全エピトープに結合し、抗体をそれ以上増やしても吸光度が変化しない状態をいい、本発明のモノクローン抗体においては、抗体量が64(=2⁶)倍希釈より高濃度である場合をいい、本発明モノクローン抗体は、このような抗体過剰域において反応特異性を解析した場合でも、ストレプトコッカス・ミュータンス(血清型c/e/f)とのみ特異的に反応して、他のストレプトコッカス属菌であるストレプトコッカス・ミティス、ストレプトコッカス・サリバリウス、及びストレプトコッカス・サンギスと反応しないものである。

【0023】なお、ストレプトコッカス属の菌について

は、1980年代以降になってもストレプトコッカス・オラリス(*S. oralis*)、ストレプトコッカス・ゴルドニイ(*S. gordonii*)等の新しい菌種が分離・報告されているが、本発明においては、以前より口腔内に多数存在することが報告されているストレプトコッカス・ミティス、ストレプトコッカス・サリバリウス、ストレプトコッカス・サンギスの3菌種について、ストレプトコッカス・ミュータンスの特異的検出を妨害するストレプトコッカス属の菌として検討した。

【0024】本発明のモノクローン抗体は、抗原結合領域(可変領域)の遺伝子構成が同一である細胞集団が産生する抗体であり、クラススイッチによるクラスが異なる抗体、遺伝子組み換え技術等の手段で調製したキメラ抗体等も含まれる。

【0025】更に、同一の特異性を有するモノクローン抗体分子をペプシンで分解して得られるF(ab')₂断片、パバインで分解して得られるFab断片のように、抗原結合能を有する特異抗体由来のフラグメントなどもモノクローン抗体と同様に使用することができる。

【0026】本発明のモノクローン抗体は、ポリエチレングリコールを用いた細胞融合によるハイブリドーマの樹立(細胞融合法)の他、電気的融合法やセンダイウイルス等によるハイブリドーマの樹立、遺伝子組み換えによる組み換え体の調製、エプシュタイン-バー(Epstein-Barr)ウイルスや発ガンプロモーター等による形質転換体の調製などによっても調製することができるが、特に、細胞融合によるハイブリドーマの樹立が好適である。

【0027】ここで、ポリエチレングリコールを用いた細胞融合によるハイブリドーマの樹立について更に詳しく説明すると、抗原の調製は、ストレプトコッカス・ミュータンスを培養して公知の方法により目的とするエピトープを有する抗原を調製する。次に、得られた抗原で動物(馬、牛、羊、ヤギ、マウス、ニワトリ等)を免疫するが、近交系動物が確立しているマウスを用いるのが一般的である。具体的には、動物への免疫方法としては、皮下注射、筋肉注射、腹腔内投与等による通常の方法や点鼻、点眼等の方法によって行うことができる。抗原の投与量は、所望の抗体価が得られ、かつ免疫動物に対して悪影響を与えない量を適宜選択すればよい。なお、必要に応じて例えばフロイント(Freund)完全アジュバント、フロイント(Freund)不完全アジュバント、水酸化アルミニウム等のアジュバントを該抗原と共に併用してもよい。

【0028】最終免疫後、抗体価が上昇していることを確認し、全血採取を行い、無菌的に脾臓を取り出し、脾細胞を得る。この脾細胞を免疫に用いた同種動物由来の継代培養した骨髓種細胞とをポリエチレングリコールの存在下で融合させてハイブリドーマをつくる。融合した細胞のみ増殖できる特殊な培養条件下で培養し、限界希

釈法（リミティング・ダイリューション）という方法を用いて目的のモノクローン抗体産生株をスクリーニングする。このハイブリドーマは免疫動物の抗体産生細胞が特異抗体を産生する能力と、骨髓種細胞が半永久的に増殖するという両者の長所を有するものである。なお、本発明のモノクローン抗体を産生する細胞としては、上記ハイブリドーマ以外にも、遺伝子組み換え体、形質転換体等が含まれる。

【0029】モノクローン抗体の調製は、細胞種に適した方法を各々選択すれば良く、細胞培養法の他、ハイブリドーマ、形質転換体については、腹腔等生体内で培養することも条件を満たせば可能である。また、モノクローン抗体の精製については、当該分野で通常行われている硫酸沈殿法、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等の各方法、及びそれらの組み合わせにより可能となる。

【0030】このようにして得られた本発明のモノクローン抗体の反応特異性は極めて高く、下記実施例で詳述するように、20%ウシ胎児血清を含有する培養上清中にモノクローン抗体が存在するような低純度のモノクローン抗体組成物を用いても、ストレプトコッカス・ミュータンスの特異的検出が可能である。従って、アフィニティークロマトグラフィー精製による高純度のモノクローン抗体だけでなく、抗原抗体反応を阻害しないような成分からなるモノクローン抗体含有組成物もストレプトコッカス・ミュータンスの検出に有用である。更に、必要に応じてアジ化ナトリウムのような防腐剤、プロテアーゼ阻害剤等を添加することも可能である。

【0031】本発明のモノクローン抗体は、う蝕予防用口腔用組成物、ストレプトコッカス・ミュータンス検出用の診断・研究用基剤などの用途に好適なものである。

【0032】う蝕予防用口腔用組成物としては、洗口剤、うがい液、歯磨剤、その他の種々の口腔用組成物の形態に調製することができ、他の成分としては組成物の種類に応じた公知の成分を常用量配合し得る。

【0033】また、ストレプトコッカス・ミュータンス検出用の診断・研究用基剤として、他の試薬と組み合わせて検査キット、診断用試薬、研究用試薬などに使用することができる。

【0034】この場合、検体中のストレプトコッカス・ミュータンスを検出する方法としては、一般的な抗原抗体反応に基づく抗原の検出方法がそのまま利用できる。例えばオクタロニー法、免疫電気泳動法、受身赤血球凝集反応法、菌体凝集法、ラテックス凝集法、酵素抗体法（enzyme-linked immunosorbent assay；ELISA法）などが挙げられるが、簡便かつ迅速に検出するならばラテックス凝集法が、原因菌の多寡を精度良く測定するならばELISA法が好ましい。なお、ヒト被検者からの検体としては、プラーク（歯垢）、唾液等が用いられる。検体は、その

まま本発明モノクローン抗体と反応させてもよく、適当な前処理を行った後、モノクローン抗体と反応させてもよい。

【0035】更に、本発明モノクローン抗体によれば、口腔内のストレプトコッカス・ミュータンスの存否・多寡を正確に検出、診断することができる上に、う蝕原性細菌であるストレプトコッカス・ミュータンスと特異的に結合する性質を利用して、モノクローン抗体を特定の不溶性担体（例えば、ラテックス等）と結合させておき、この抗体結合担体と結合したストレプトコッカス・ミュータンスを口腔内から特異的に排除することができるので、う蝕の効果的な予防が可能となるものである。

【0036】

【実施例】以下、実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明は下記実施例に制限されるものではない。なお、特に記述がない限り、温度は室温で操作し、pHは20～25℃におけるpHを示す。蛋白質量は280nmの吸光度測定結果からその濃度を算出した。

【0037】[実施例1]

1. 抗原の調製

(1) ストレプトコッカス・ミュータンス ATCC 25175（血清型c、以下、*S. mutans* ATCC 25175と記す）をTPY培地（トリプティケース・ペプトン・フィトニーイースト抽出物培地）を用いて、37℃で培養して得た培養液上清に、硫酸アンモニウムを60%飽和となるように添加して得た硫酸沈殿画分を50mMトリス-塩酸緩衝液（pH7.5；4℃）に溶解し、同緩衝液に対して4℃で透析し、透析膜内液を回収した。

(2) 透析膜内液を上記緩衝液で平衡化したDEAE-セルロースカラムに通し、カラムを同緩衝液で洗浄後、連続直線のイオン強度濃度勾配（0～0.3M塩化ナトリウム）をかけて蛋白質抗原cを含有する画分を得た。同画分を硫酸アンモニウムで再度塩析して得た沈殿画分を、10mMリン酸緩衝液（pH7.4）に溶解し、粗蛋白質抗原c画分とした。

(3) 同画分を上記リン酸緩衝液で平衡化したセファローース-6Bカラムを用いたゲルろ過を行い、精製蛋白質抗原c画分を得た。同画分を分子量30,000以上をカットするフィルターを用いて濃縮し、凍結保存した。更にその一部を精製水に対して透析した後、冷凍保存した。なお、上記精製工程における蛋白質抗原cの確認は、メルカプトール存在下で熱変性させた試料をドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分離し、190キロダルトンに相当する蛋白質抗原cバンドの存在を指標として行った。純度の検定も同様に行った。

【0038】2. マウスの免疫

(1) BALB/c A J c1マウス（雄性、8週齢、日本クレア株式会社）を用いた。10mMリン酸緩衝化

生理食塩水 (pH7.4、以下、PBSと記す) を用いて蛋白質抗原c溶液 (1mg/ml) を調製し、同量の Freund の完全アジュバントとよく混和してエマルジョンを調製し、マウス腹腔内にエマルジョン0.2ml (蛋白質抗原cとして100μg) を投与した。

(2) 初回免疫から2~3週間後、Freund の不完全アジュバントを用いて同様に調製した蛋白質抗原c含有エマルジョン0.2ml (蛋白質抗原cとして100μg) を同様に投与した。

(3) 更に、2~3週間後、PBSを用いて蛋白質抗原c溶液 (0.5mg/ml) を調製し、その0.1ml (蛋白質抗原cとして50μg) をマウス尾静脈から投与した。

【0039】3. 脾細胞調製 (最終免疫から3日目)

(1) マウスをエーテル麻酔下、眼窩静脈叢および心臓から採血した後に瀉血し、無菌的に脾臓を摘出し、イスコフ改変ダルベッコ培地 (以下、IMDMと記す) で数回洗浄後、20%ウシ胎児血清添加イスコフ改変ダルベッコ培地 (以下、IMDM+20%FBSと記す) 中に浸漬した。

(2) 切開した脾臓を平ピンセットでつぶし、ステンレススチール・メッシュ#200を通過させ、脾臓細胞懸濁液を得た。

(3) トリバンブルー染色を行い、血球計算盤で生細胞数を測定した。

【0040】4. ミエローマ細胞の調製

BALB/cマウス由来のミエローマ細胞であるSp2/0-Ag14細胞をIMDM+20%FBSを用いて炭酸ガス培養装置 (37℃、95%空気+5%CO₂) *

* 内で培養した。細胞融合実施時、脾細胞と同様にして生細胞数を測定した。

【0041】5. 細胞融合処理

(1) ミエローマ細胞懸濁液と脾細胞懸濁液を、生細胞数比が1:5となるように混合し、400×gで5分間遠心分離して得た細胞塊をIMDMで再懸濁し、再度遠心分離して細胞塊を得た。タッピングにより細胞塊を良くほぐした。

(2) ポリエチレングリコール4000溶液 (50w/w%となるようにIMDMで溶解した溶液) 1mlを1分間かけて滴下し、1分間良く混合した。

(3) 10mlのIMDMを取り、1mlを1分間、1mlを1分間、8mlを3分間かけて滴下した後、同様に遠心分離をし、細胞塊を回収した。

(4) HAT選択培地 (IMDM+20%FBSに、ヒポキサンチン (H)、アミノプテリン (A)、チミジン (T) を各々、100μM、0.4μM、16μMとなるように添加した培養液) を脾細胞濃度が5×10⁵個/mlとなるように添加し、細胞懸濁液を調製した。

20 (5) 上記懸濁液を96マルチウェルプレート (コーニング ラボラトリー サイエンスカンパニー: CORNING Laboratory Sciences Company, 25860MP) に1ウェル当たり0.1ml添加し、炭酸ガス培養装置で培養した。

(6) 数日後、HAT選択培地を適宜追加した。

【0042】6. 菌体結合プレートの調製

次の15種類のストレプトコッカス属の菌を用いて菌体結合プレートを調製した。

<i>S. mutans</i>	ATCC25175 (血清型c)
<i>S. mutans</i>	Ingbritt (" c)
<i>S. mutans</i>	MT703 (" e)
<i>S. mutans</i>	OMZ175 (" f)
<i>S. cricetus</i>	E49 (" a)
<i>S. rattus</i>	ATCC19645 (" b)
<i>S. ferus</i>	ATCC33477 (" c)
<i>S. sobrinus</i>	B13 (" d)
<i>S. sobrinus</i>	OMZ176 (" d)
<i>S. sobrinus</i>	6715 (" g)
<i>S. downei</i>	ATCC33748 (" h)
<i>S. sanguis</i>	ATCC10556
<i>S. mitis</i>	ATCC49456
<i>S. salivarius</i>	ATCC7073
<i>S. oralis</i>	ATCC35037

【0043】このうち、酵素抗体法によるクローン選択には、*S. mutans* Ingbritt、*S. mutans* MT703、*S. mutans* OMZ175、*S. sobrinus* B13、*S. sobrinus* 6715、*S. sanguis* ATCC10556、*S. mitis* ATCC49456、*S. sa*

livarius ATCC7073、*S. oralis* ATCC35037の9種類を用いた。それ以外の菌は、ハイブリドーマ樹立後のモノクローン抗体の特異性検討にのみ用いた。

50 (1) 3.7w/v%ブレイン ハート インフュージョン (Brain Heart Infusion) 培

地を用いて上記各菌を培養した後、遠心分離により菌体を回収した。

(2) 得られた菌体をPBS中に再懸濁した後、遠心分離により菌体を回収した。この操作を3回繰り返して菌体をPBS洗浄した後、PBSを用いて懸濁液を調製し550nmにおける吸光度(A_{550})を測定した。

(3) PBSを用いて550nmにおける吸光度(A_{550})が0.3となるような菌体懸濁液を調製した。血液平板で生菌数を調べた結果、 A_{550} が0.3の各菌体懸濁液は約 1×10^3 cfu/ml (colony forming unit/ml) に相当した。

(4) 上記懸濁液を酵素抗体法用96マルチウェルプレート(コーニング コースター コーポレーション: Corning Costar Corporation, 3590)に1ウェル当たり0.1ml添加し、4℃で1週間静置した。

(5) ウェル表面が菌体で飽和されていることを確認した後、ウェルの内容物を捨て、0.05w/v% Tween 20 (Tween 20) を添加したPBS (以下、洗浄液と記す) で3回洗浄した。続いて、1w/v% ウシ血清アルブミンを添加したPBSでウェルを満たし、37℃で1時間放置してブロッキング処理を行った。ブロッキング処理後のプレートは使用時まで4℃で保存した。

7. 酵素抗体法によるクローン選択

上記5. の細胞融合後、肉眼で細胞のコロニーが確認できたウェルについて以下の酵素抗体法を実施し、ストレプトコッカス・ミュータンスに対するモノクローン抗体の存否を確認した。

(1) 培養上清50μlを無菌的に採取し、0.1w/v% ウシ血清アルブミンを含有するPBS (以下、希釈液と記す) 500μlが入っているチューブに添加して希釈した。希釈培養上清を上記6. の9種類の各菌体結合プレートに1ウェル当たり50μl添加し、ラップをして37℃で1~2時間反応させ、洗浄液で3回洗浄した。

(2) 希釈液で1000倍に希釈した抗マウスIgG + A + M (H + L) ウサギF(ab')₂-アルカリ性ホスファターゼ標識(ザイメッド ラボラトリーズインク: ZYMED LABORATORIES, INC., 61-6322) 溶液50μlを添加し、同様に1時間反応させた後に洗浄した。

(3) 基質溶液(0.5mM塩化マグネシウムを添加した1Mジエタノールアミン緩衝液(pH9.8)中にp-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム六水和物を1mg/mlとなるように溶解した溶液)100μlを添加し、室温で20分~1時間静置した後、405nmにおける吸光度を測定した。

(4) ストレプトコッカス・ミュータンス(血清型c/e/f)とのみ反応して発色した試料を陽性とした。陽

性ウェルの中で特に吸光度の大きいウェルから細胞を回収し限界希釈法によるクローニングを実施した。直ちに限界希釈法を行わない場合は、HAT選択培地からアミノプテリンのみを除いた組成の培地(以下、HT培地と記す)をウェル当たり1滴ずつ(50~60μl相当)添加した。

8. 限界希釈法によるクローニング

(1) 7. の酵素抗体法で陽性となったウェルから細胞を培養上清とともに回収し、細胞懸濁液中の生細胞数を測定した。

(2) 細胞を段階的に希釈し、10細胞/ml相当の細胞懸濁液を調製した。この懸濁液はHT培地にエンドセリアルセルグロースサブメント: Endothelial cell growth supplement (シグマケミカルカンパニー: SIGMA CHEMICAL COMPANY, E-2759) を50μg/mlとなるように添加したものをを用いて調製した。

(2) 96マルチウェルプレートに細胞懸濁液を0.1ml/ウェル(1細胞/ウェルに相当)となるように分注し、同様に培養した。以後、HT培地を適宜追加した。

(3) 単一コロニーが出現したウェルの培養上清を採取し、上記7. の酵素抗体法と同様にしてクローン選択を行った。

(4) 酵素抗体法で陽性であることを確認したウェルの細胞について、限界希釈法を合計で連続3回繰り返した。3回目の限界希釈法を実施後に、陽性出現率が高いことを確認できたハイブリドーマについては、クローンを樹立したと判断した。

9. 細胞株の保存

(1) 樹立した細胞をそれぞれ、24マルチウェルプレート(HT培地1ml/ウェル)で増殖後、6マルチウェルプレート(HT培地4ml/ウェル)で増殖させ、培養上清の反応性を上記7. と同様の酵素抗体法で確認した。この培養上清を凍結保存し、反応特異性の解析実験に使用した。

(2) 10v/v%ジメチルスルフォキシドを含有するウシ胎児血清を用いて調製した細胞懸濁液を凍結保存用アンプルに分注し、-100℃まで緩やかに冷却した後、液体窒素中で保存した。

10. 反応特異性の解析(酵素抗体法)

(1) ハイブリドーマの培養上清(基本組成はHT培地)を希釈液を用いて、2倍段階希釈を行い、2~1024倍(2^{-1} ~ 2^{-10})希釈液を調製した。

(2) 2倍段階希釈した各培養上清を上記6. の15種類の各菌体結合プレートの1ウェル当たり100μl添加し、ラップをして37℃で1~2時間反応させ、洗浄液で3回洗浄した。対照として希釈液100μlを添加し、以下同様に操作した。

(3) 希釈液で1000倍に希釈した抗マウスIgG+A+M(H+L)ウサギF(ab')₂-アルカリ性ホスファターゼ標識(ザイメッド ラボラトリーズインク: ZYMED LABORATORIES, INC., 61-6322)100μlを添加し、同様に1時間反応させた後に洗浄した。

(4) 基質溶液(0.5mM塩化マグネシウムを添加した1Mジエタノールアミン緩衝液(pH9.8)中にp-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム六水和物を1mg/mlとなるように溶解した溶液)を添加し、室温で1時間放置後、405nmにおける吸光度を測定した。

(5) 対照として用いた希釈液を添加したウェルの吸光度をバックグラウンドと考え、各々測定した吸光度から対照の吸光度を引いたものをネットの発色としてデータを処理した。

(6) この結果、目的とする反応特異性を満足するモノクローン抗体として、ハイブリドーマH0117が産生するモノクローン抗体MAb0117と、同じく、ハイブリドーマH0611が産生するモノクローン抗体MAb0611を得た。

【0044】なお、ストレプトコッカス・ミュータンス(血清型c/e/f)との反応の程度がより揃っているMAb0117の方が、ストレプトコッカス・ミュータンスの検出により適しているとの結果を得た。モノクローン抗体MAb0117のストレプトコッカス属の菌との抗原抗体反応の容量-作用曲線を図1に示した。

【0045】図1の横軸は、ハイブリドーマH0117培養上清の希釈率($2^{-10}=1024$ 倍希釈が最低濃度、 $2^{-1}=2$ 倍希釈が最高濃度)を示し、縦軸は、抗原抗体反応の反応性を吸光度で示した。なお、吸光度のデータはS. mutans ATCC25175(ストレプトコッカス・ミュータンスのタイプ ストレイン)に対する2倍希釈培養上清の吸光度を1とした場合の各吸光度を、相対比で表示した。この場合、相対比1は吸光度1.3に相当する。

【0046】図1の結果から、モノクローン抗体MAb0117は、ストレプトコッカス・ミュータンス(血清型c/e/f)に対し、64($=2^6$)倍希釈より高濃度の場合、反応すべき全エピトープにモノクローン抗体MAb0117が結合して吸光度がプラトーとなっていることがわかった。この時、他のストレプトコッカス属の菌に対する吸光度はバックグラウンドに相当する0を示し、モノクローン抗体MAb0117は他のストレプトコッカス属の菌と全く反応しないことが確認できた。

1.1. MAb0117、MAb0611のアイソタイピング

ハイブリドーマH0117、H0611の培養上清を検体として、モノクローン抗体MAb0117、MAb0611のアイソタイピングをマウスモノクローナル抗体アイソタイピングキット(ギブコ ビー・アール・エ

ル: GIBCOBRL, 10126-027)を用いて行った結果、ともにクラスはIgG₁、L鎖のタイプはκであった。

1.2. ハイブリドーマの寄託

ハイブリドーマH0117は、工業技術院生命工学工業技術研究所、特許微生物寄託センターにMouse-Mouse hybridoma H0117、受託番号FERM P-15659として寄託されている。

【0047】[実施例2]モノクローン抗体の精製

1. 抗原結合アフィニティーカラムの調製

実施例1で調製した精製蛋白質抗原cとCNBr-activated Sepharose 4B(ファルマシア バイオテック株式会社, 17-0430-01)を用い、添付のマニュアル(Affinity Chromatography principles & methods)に従い、蛋白質抗原c結合アフィニティーカラムを調製した。

【0048】2. マウス腹腔内でのH0117の培養、腹水の採取

(1) BALB/cA Jc1マウス(雄性、8週齢、日本クレア株式会社)に2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカンをマウス1匹当たり0.5ml腹腔内に投与した。

(2) 3~4週間後、IMDM+20%FBSで培養したハイブリドーマH0117をPBSで3回洗浄し、PBSを用いて生細胞数が 2×10^7 個/mlとなるような細胞懸濁液を調製した。マウス1匹当たり0.5mlの細胞懸濁液を腹腔内に投与した。

(3) 腹水の貯留が認められたマウスから、経時的に腹水を採取した。

(4) 腹水に同量のPBSを添加し、1000×g、20分間遠心分離を行い、上清を回収した。上清は直ちに蛋白質抗原c結合アフィニティーカラムによるモノクローン抗体の精製に使用した。精製が直ちにできない場合は-20℃で精製操作まで保存した。

【0049】3. 精製モノクローン抗体の調製

(1) 腹水の上清画分を蛋白質抗原c結合アフィニティーカラムに通した。

(2) 同カラムをPBSで十分に洗浄した。

(3) 0.1Mグリシン塩酸緩衝液(pH2.7)でモノクローン抗体を溶出させた。溶出後、直ちに1/10容量の1Mトリス塩酸緩衝液(pH8.4)で中和し、各溶出画分の280nmにおける吸光度(A_{280})を測定した。

(4) 回収したモノクローン抗体画分を4℃でPBSに対して透析し、透析膜内液をセントリカットU-50(倉敷紡績株式会社)で濃縮し、モノクローン抗体溶液を調製した。

(5) モノクローン抗体の濃度が10mg/mlとなるようにPBSで希釈した。なお、モノクローン抗体の濃

度は、1%溶液の A_{280} を14として換算した。

【0050】モノクローン抗体MAb0611を産生するハイブリドーマH0611についても上記H0117と同様に操作し、精製モノクローン抗体MAb0611を得た。

【0051】〔実施例3〕標識抗体

1. Fabの調製

Immunopure Fab Preparation Kit (ピアスケミカル カンパニー: Pierce Chemical Company, 44885) を用いてモノクローン抗体MAb0117のFabを調製した。

【0052】2. 酵素標識化

Immunopure Maleimide Alkaline Phosphatase Conjugation Kit (ピアスケミカル カンパニー, 31492) を用いて、アルカリホスファターゼ標識化Fabを調製した。0.1w/v%ウシ血清アルブミン添加PBSを用いて、Fabとして10 μ g/mlとなるように調製した。

【0053】〔実施例4〕診断用キット

下記内容からなるストレプトコッカス・ミュータンスの検出キットを作成した。

1. パラフィンベレット

2. プラスチックカップ

3. プラスチックスポイト

4. 免疫反応用チューブ

モノクローン抗体MAb0611をコーティングしたチューブ

PBSを用いて、モノクローン抗体MAb0611 (IgGとして10 μ g/ml) を調製し、ポリスチレン製チューブの表面にモノクローン抗体MAb0611を吸着させた後、ウシ血清アルブミンでブロッキング処理し、0.1w/v%ウシ血清アルブミン添加PBSで満たしたもの。

5. 標識抗体溶液

〔実施例5〕菌磨

プロピレングリコール	3.0
カルボキシメチルセルロース	1.5
メチルパラベン	0.2
ブチルパラベン	0.02
安息香酸ナトリウム	0.1
60%ソルビトール液	30.0
サッカリンナトリウム	0.2
モノフルオロリン酸ナトリウム	0.76
カゼイン	0.5
ショ糖モノラウリン酸エステル	1.5
ラウリル硫酸ナトリウム	0.1
香料	1.0
色素	0.01

* 実施例3で調製したもの

6. 基質

p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム六水和物56mg

7. 基質溶解液

1mM塩化マグネシウムを含む1Mジエタノールアミン緩衝液 (pH9.8)

8. 陽性対照

所定のcfuに相当するS. mutans懸濁液

1 $\times 10^4$ cfu/ml、1 $\times 10^5$ cfu/ml、1 $\times 10^6$ cfu/ml

9. 洗浄液

PBSで調製した0.05w/v%ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート溶液

10. 反応停止液

2N水酸化ナトリウム

上記キットの具体的な取扱い方法を以下に説明する（唾液が検体の場合）。

1) 測定に先立って、下記の試薬を調製する。基質に基質溶解液10mlを添加、溶解させ、基質溶液とする。

2) パラフィンベレットを5分間噛んだ後、唾液をプラスチックカップに取る。

3) プラスチックスポイトで唾液を0.5ml取り、免疫反応用チューブの底の部分に5滴落とし、10分間放置する。

4) 洗浄液で免疫反応用チューブを3回洗浄する。

5) 免疫反応用チューブに標識抗体溶液を5滴加え、10分間放置した後、同様に洗浄する。

6) 基質溶液を10滴加え、よく混ぜてからそのまま放置し、発色の程度を観察する。

7) 陽性対照に発色を認めたら反応停止液を1滴加える。

8) 陽性対照及び検体の発色の程度を比較し、検体中のS. mutans濃度を判定する。

【0054】

*

17	18
水酸化アルミニウム	45.0
MAb0117 (IgGとして10mg/ml)	0.5
精製水	残
合 計	100 重量部

【0055】

〔実施例6〕洗口剤

ポリオキシエチレン(60)硬化ヒマシ油	2.0
カラギーナン	0.01
リン酸二ナトリウム	1.3
クエン酸	0.9
サッカリンナトリウム	0.2
フッ化ナトリウム	0.042
ゼラチン	2.0
60%ソルビトール液	15.0
香料	1.0
色素	0.01
MAb0117 (IgGとして10mg/ml)	0.01
精製水	残
合 計	100 重量部

【0056】

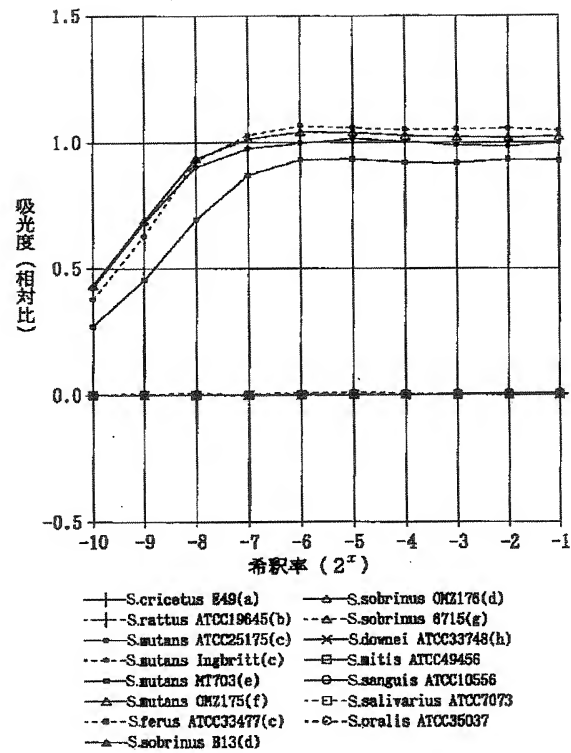
【発明の効果】以上に説明したとおり、本発明のモノクローン抗体は、極めて高い反応特異性を有しており、口腔内のう蝕原性細菌であるストレプトコッカス・ミュータンスを他のストレプトコッカス属の近縁種と区別して認識できるので、ストレプトコッカス・ミュータンスの特異的検出とその排除が可能となる。このことはう蝕発

20 生の予防、治療に対して有効な手段を提供し、口腔衛生の増進に寄与し得るものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のモノクローン抗体MAb0117とストレプトコッカス属の菌との抗原抗体反応の容量-作用曲線を示すグラフである。

【図1】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

C 1 2 P 21/08

G 0 1 N 33/569

33/577

//C 1 2 P 21/08

C 1 2 R 1:91

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

G 0 1 N 33/577

B

C 1 2 N 5/00

B

15/00

C

9282-4B